



# BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 01 AVR. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
[www.inpi.fr](http://www.inpi.fr)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



26 bis, rue de Saint Pétersbourg - 75800 Paris Cedex 08

Pour vous informer : INPI DIRECT

N° Indigo 0 825 83 85 87

0,15 € TTC/mn

Télécopie : 33 (0)1 53 04 52 65

Réservé à l'INPI

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

  
N° 11354\*03

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 @ W / 030103

## REMISE DES PIÈCES

DATE

11 JUIL 2003

LIEU

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

0308538

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

11 JUIL 2003

PAR L'INPI

## Vos références pour ce dossier

(facultatif) 240772 D21449 MIP

### 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE

## Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

## 2 NATURE DE LA DEMANDE

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Demande de brevet

☒

Demande de certificat d'utilité

☐

Demande divisionnaire

☐

Demande de brevet initiale

N°

Date

ou demande de certificat d'utilité initiale

N°

Date

Transformation d'une demande de

brevet européen Demande de brevet initiale

☐

N°

Date

## 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

Nouveaux immunoconjugués antitumoraux

## 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

## 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

☒ Personne morale☐ Personne physique

Nom

ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Domicile

Rue

ou

siège

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

PIERRE FABRE MEDICAMENT

SOCIETE ANONYME

326118502

45, place Abel Gance

92100 BOULOGNE-BILLANCOURT

FRANCE

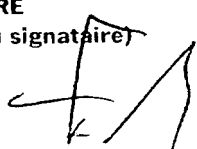
Française

N° de télécopie (facultatif)

☐ S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

**BREVET D'INVENTION**  
**CERTIFICAT D'UTILITÉ**
**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE**  
 page 2/2

**BR2**

REMISE DES PIÈCES DATE <b>11 JUIL 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0308538</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	DB 540 W / 030103
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		240772 MIP Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		<input checked="" type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input checked="" type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/>	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>  92-1001		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI L. MARIELLO	

La présente invention est relative à de nouveaux composés comprenant un agent actif cytotoxique et/ou cytostatique couplé à un système d'adressage. Plus particulièrement, la présente invention concerne un composé comprenant un alcaloïde de *Vinca* couplé à un anticorps capable de se lier spécifiquement au récepteur humain du facteur de croissance 1 apparenté à l'insuline IGF-1R et/ou capable d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-1R, notamment monoclonal d'origine murine, chimérique, primatisé, humanisé et humain. L'invention porte également sur le mode de couplage des éléments dudit composé et comprend aussi l'utilisation de ces composés à titre de médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique du cancer, plus particulièrement des cancers surexprimant l'IGF-1R ou de toute pathologie liée à la surexpression dudit récepteur.

Actuellement, avec la chirurgie et la radiothérapie, la chimiothérapie représente un des moyens les plus efficaces pour lutter contre le cancer. De nombreux agents cytotoxiques et/ou cytostatiques ont été isolés ou synthétisés et permettent de détruire ou de réduire, si ce n'est définitivement, au moins de manière significative les cellules tumorales. Cependant, l'activité toxique de ces agents n'est pas limitée aux cellules tumorales mais les cellules non tumorales sont également touchées et peuvent être détruites. Plus particulièrement, des effets secondaires sont observés sur les cellules à renouvellement rapide comme les cellules hématopoïétiques ou les cellules de l'épithélium, notamment des muqueuses. A titre d'illustration, les cellules du tractus gastro-intestinal sont fortement touchées par l'utilisation de cytotoxiques.

Un des buts de la présente invention est de pouvoir disposer d'un composé permettant de limiter les effets secondaires sur les cellules saines tout en conservant une forte cytotoxicité sur les cellules tumorales.

Selon une approche originale, la demanderesse a cherché, plutôt que de développer de nouvelles molécules, à pallier au problème de toxicité de molécules connues en limitant l'accès desdites molécules aux cellules tumorales. Pour ce faire, la demanderesse a développé un système d'adressage de type anticorps permettant de cibler uniquement les cellules tumorales.

Un des avantages de cette approche est de pouvoir utiliser des cytotoxiques connus et bien définis au niveau pharmacologique et pharmacocinétique. En outre, il est

alors possible d'utiliser des cytotoxiques forts jusqu'à présent délaissés au profit de cytotoxiques moins forts dont l'index thérapeutique est meilleur (donc présentant moins d'effets secondaires).

Un autre avantage réside dans l'utilisation d'un anticorps, c'est-à-dire d'un produit d'origine biologique ne rajoutant pas de toxicité à celle du cytotoxique. De plus, comme il sera développé par la suite, le choix de l'anticorps permet de cumuler à l'action du cytotoxique sa propre activité biologique.

La Demanderesse a mis en évidence que l'utilisation d'un alcaloïde de *Vinca* couplé à un dispositif d'adressage présente un intérêt en chimiothérapie.

Selon un premier aspect, la présente invention a pour objet un composé comprenant au moins une molécule d'agent actif couplé à un système d'adressage, ladite au moins une molécule d'agent actif étant un composé cytotoxique et/ou cytostatique fort choisi parmi les alcaloïdes de *Vinca* et ledit système d'adressage étant un anticorps polyclonal ou monoclonal pouvant être bispécifique, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de cibler, de préférence spécifiquement, les cellules tumorales.

Un avantage d'un composé selon l'invention est que l'agent actif est directement amené par l'anticorps au niveau des cellules cibles et, outre le fait de ne pas dégrader les autres cellules, son activité biologique n'est pas diminuée.

Un des avantages liés à l'utilisation d'anticorps comme système d'adressage est qu'il est possible de leur coupler plusieurs agents actifs, augmentant ainsi l'efficacité du composé. En effet, le composé étant directement amené au niveau des cellules cibles, le fait de disposer de plusieurs agents actifs n'entraînera pas d'augmentation des effets secondaires, mais uniquement une augmentation de l'effet *in situ* souhaité sur les cellules tumorales.

A titre d'exemples non limitatifs d'anticorps de ciblage utilisables selon l'invention, on peut citer, sans aucune limitation, les anticorps CeaVac visant les cellules tumorales colorectales, Y Theragyn/pentumomab et OvaRex visant les cellules tumorales ovariennes.

La présente invention concerne un composé tel que décrit plus haut qui comprend de 1 à 50 molécules d'agent actif, préférentiellement de 1 à 10 et encore mieux de 1 à 6. Le choix du nombre de molécules d'agent actif dépend, entre autre, du

poids moléculaire de chacun des éléments. Par exemple, à titre indicatif, pour un anticorps de type IgG1 d'un poids moléculaire de 150 000 Da, il est préféré de coupler de 4 à 6 molécules de vinblastine d'un poids moléculaire de 900 Da (Petersen et al., Cancer Res., 1991, 51:2286). Si l'anticorps est conjugué avec une quantité trop  
5 importante de cytotoxiques, ceux-ci risquent de masquer le site de reconnaissance pour l'antigène et diminuer son activité.

Dans la pratique, le composé objet de l'invention est utilisé à titre de médicament et, plus particulièrement, de médicament destiné au traitement du cancer.

La présente invention se distingue de l'art antérieur en ce sens que le choix de  
10 l'anticorps vise non seulement le ciblage de cellules tumorales comme décrit plus haut, mais également en ce que ledit anticorps présente une activité intrinsèque sur les cellules tumorales.

Selon une autre forme d'exécution de l'invention, le composé tel que décrit plus haut est également capable d'inhiber la prolifération des cellules tumorales et/ou la  
15 restauration des fonctions apoptotiques en bloquant les signaux de transduction, la progression des cellules en cycle cellulaire et/ou la disponibilité du récepteur en membrane (phénomènes d'internalisation et de dégradation dudit récepteur) ou de réverter un phénotype de résistance à l'apoptose dans le cas d'un anticorps dirigé contre l'IGF-1R dans la mesure où il est largement décrit qu'une surexpression de ce récepteur  
20 confère aux cellules tumorales un moyen de résister à l'apoptose et notamment par l'apoptose induite par les composés de chimiothérapie (Beech D. J. et al., Oncology reports, 2001, 8:325-329 ; Grothe A. et al., J. Cancer Res. clin Oncol., 1999, 125:166-173). Un autre mécanisme d'action du composé tel que décrit ci-dessus peut être lié à la partie Fc de l'anticorps, si un anticorps entier est utilisé, et consister en la mise en place  
25 de mécanismes effecteurs tels que l'ADCC (cytotoxicité cellulaire anticorps dépendante) et la CDC (cytotoxicité dépendante du complément).

A titre d'exemple non limitatif d'anticorps, on peut citer l'Avastin/Bevacizumab agissant au niveau des cancers colorectaux en interférant avec l'angiogénèse tumorale, le Rituxan/rituximab dont l'activité est principalement liée aux fonctions effectrices de  
30 la molécule et notamment l'ADCC ainsi que l'Herceptin/trastuzumab agissant par

inhibition de transduction des signaux, inhibition de la progression des cellules en cycle cellulaire et également en grande partie par mise en route de mécanismes d'ADCC.

Les alcaloïdes de *Vinca* correspondent à la famille de composés naturels dont la vinblastine, la vincristine, l'anhydrovinblastine et la leurosine, présents en quantité dans  
5 les plantes, sont des exemples démonstratifs.

Par alcaloïdes de *Vinca*, il faut aussi entendre tous les dérivés présents en faible quantité comme la déoxyvinblastine, la leurosidine pris à titre d'exemples non limitatifs. Il faut aussi entendre les dérivés de structure naturelle mais obtenus par synthèse comme, sans aucune limitation, l'anhydrovinblastine.

10 Par alcaloïde de *Vinca* il faut aussi entendre l'ensemble des composés dérivés de ces composés naturels par modification chimique ou biochimique en une ou plusieurs étapes. Ces modifications peuvent porter sur la partie "vindoline" ou sur la partie "velbanamine" ou sur les deux parties simultanément. Les alcaloïdes de *Vinca*, en tant que tels, sont connus de l'homme de l'art (Antitumor Bisindole Alkaloids from  
15 *Catharanthus roseus* (L.)). The Alkaloids, Brossi A. et al., M. Ed. Academic Press Inc. San Diego, vol. 37, 1990 ; Jacquesy J.C. et al., Biomedical Chemistry: Applying Chemical Principles to the Understanding and Treatment of Disease, édité chez Torrence, P.F., John Wiley and Sons Inc.: New York, 2000, pp. 227-246 ; Fahy J. et al., J. Current Pharm. Des., 2001, 7:1181-97 ; Duflos A. et al., Novel Aspects of Natural  
20 and Modified *Vinca* Alkaloids. Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents, 2002, 2:55-70).

Les dérivés préférés selon la présente invention sont ceux qui présentent un intérêt pharmacologique établi par des tests de cytotoxicité, d'activité sur certaines cibles spécifiques, comme la tubuline, ou ayant démontré des avantages lors de tests *in vivo*  
25 sur l'animal. Parmi ces composés on peut citer les dérivés actuellement utilisés dans les chimiothérapies anticancéreuses : la vinblastine, la vincristine, la vindésine et la vinorelbine ainsi que les dérivés ayant démontré un intérêt lors d'études cliniques telles que la vinépidine, la vinfosiltine, la vinzolidine et la vinflunine.

L'invention repose donc, en partie, sur le choix d'un cytotoxique original contre  
30 tout préjugé de l'art antérieur.



Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un composé tel que décrit plus haut dans lequel ledit alcaloïde de *Vinca* est sélectionné parmi la vinblastine, la déoxyvinblastine, la déoxyleurosidine, la vincristine, la vindésine, la vinorelbine, la vinépidine, la vinfosiltine, la vinzolidine, la vinflunine.

5 L'objet de l'invention a plus précisément été mis en évidence et exemplifié à l'aide de la déoxyvinblastine et de son isomère 4'-S, communément dénommé déoxyleurosidine.

La structure de chacun de ces deux composés est décrite depuis de nombreuses années mais leur activité pharmacologique est considérée comme modérée ou faible  
10 (Neuss N. et al., Tetrahedron Letters, 1968, N° 7, pp 783-7 ; United State Patent 4,143,041, Eli Lilly and Company, Filed Nov. 25, 1977 ; et récemment Kuehne M. E. et al., J. Org. Chem., 1989, 54, 14:3407-20 ; Kuehne M. E., Org. Biomol. Chem., 2003, 1:2120-36). Leur réel intérêt en tant que composé doué d'une activité pharmacologique antitumorale incontestable n'avait jamais été décrit et mis en évidence par des  
15 expérimentations *in vivo* sur des modèles de tumeur murine.

La présente invention concerne donc un composé tel que décrit plus haut dans lequel ledit alcaloïde de *Vinca* est la déoxyvinblastine (4'-R) et/ou la déoxyleurosidine (4'-S).

L'activité supérieure de ces deux dérivés a été mise en évidence contre la  
20 leucémie murine P388 greffée par voie intraveineuse au jour 0. Le composé est administré par voie intra péritonéale en simple dose au jour 1. Le protocole de ce test est décrit par Kruczynski A. et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1998, volume 41, pages 437 à 447.

Classiquement, l'activité *in vivo* de composés cytotoxiques est exprimée par le  
25 T/C à une dose exprimée en mg par kg. Le T/C correspond au rapport, multiplié par 100, de la médiane du temps de survie des animaux traités sur la médiane du temps de survie des animaux contrôles.

A titre d'exemple, pour des cytotoxiques utilisés à ce jour, l'activité maximale du sulfate de vinblastine est exprimée à la dose de 5 mg/kg avec T/C = 143. L'activité  
30 maximale du sulfate de vincristine est exprimée aux doses de 1,25 et 2,5 mg/kg avec T/C = 143 dans les deux cas.

De façon inattendue, le ditartrate de déoxyvinblastine exprime son activité maximale à la dose de 20 mg/kg avec T/C = 214 et le ditartrate de déoxyleurosidine exprime son activité maximale à la dose de 2,5 mg/kg avec T/C = 200.

Au vu de ces résultats, la présente invention concerne donc l'utilisation de la  
5 déoxyvinblastine (4'-R) et/ou la deoxyleurosidine (4'-S), collectivement appelé déoxyvinblastine dans la suite de la description, pour le traitement du cancer.

Selon une forme préférée, comme décrit plus haut, la présente invention envisage le couplage de la déoxyvinblastine à un composé de type anticorps monoclonal ou polyclonal, de préférence monoclonal.

10 Plus particulièrement, comme il sera décrit par la suite, un anticorps préféré entrant dans le composé objet de la présente invention est un anticorps monoclonal ou polyclonal, de préférence monoclonal, qui reconnaîtra spécifiquement et avec une forte affinité l'IGF-IR et qui présentera la capacité d'inhiber la croissance des tumeurs, plus particulièrement des tumeurs exprimant l'IGF-IR.

15 Le récepteur du facteur de croissance I apparenté à l'insuline dénommé IGF-IR ("IGF-IR" pour "Insuline-like Growth Factor-I Receptor") est un récepteur à activité tyrosine kinase comportant 70 % d'homologie avec le récepteur à l'insuline IR ("IR" pour "Insuline Receptor"). L'IGF-IR est une glycoprotéine de poids moléculaire d'environ 350 000. C'est un récepteur hétérotétramérique dont chaque moitié -reliée par  
20 des ponts disulfure- est composée d'une sous unité  $\alpha$  extracellulaire et d'une sous unité  $\beta$  transmembranaire. L'IGF-IR fixe l'IGF I et l'IGF II avec une très forte affinité ( $K_d \approx 1$  nM) mais est également capable de se lier à l'insuline avec une affinité 100 à 1 000 fois moindre. Inversement, l'IR fixe l'insuline avec une très forte affinité alors que les IGFs ne se fixent au récepteur à l'insuline qu'avec une affinité 100 fois inférieure. Le domaine  
25 tyrosine kinase de l'IGF-IR et de l'IR présente une très forte homologie de séquence alors que les zones de plus faible homologie concernent respectivement la région riche en cystéine située sur la sous unité  $\alpha$  et la partie C-terminale de la sous unité  $\beta$ . Les différences de séquences observées dans la sous unité  $\alpha$  sont situées dans la zone de fixation des ligands et sont donc à l'origine des affinités relatives de l'IGF-IR et de l'IR  
30 pour les IGFs et l'insuline respectivement. Les différences dans la partie C-terminale de la sous unité  $\beta$  résultent en une divergence dans les voies de signalisation des deux

récepteurs ; l'IGF-IR médiant des effets mitogéniques, de différenciation et d'anti-apoptose, alors que l'activation de l'IR entraîne principalement des effets au niveau des voies métaboliques (Baserga et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1332:F105-126, 1997 ; Baserga R., *Exp. Cell. Res.*, 253:1-6, 1999).

5 Les protéines tyrosine-kinases cytoplasmiques sont activées par la fixation du ligand au domaine extracellulaire du récepteur. L'activation des kinases entraîne à son tour la stimulation de différents substrats intracellulaires, incluant l'IRS-1, l'IRS-2, Shc et Grb 10 (Peruzzi F. et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:166-173, 1999). Les deux substrats majeurs de l'IGF-IR sont IRS et Shc qui médient, par l'activation de nombreux  
10 effecteurs en aval, la plupart des effets de croissance et de différenciation liés à la fixation des IGFs à ce récepteur. La disponibilité de substrats peut par conséquent dicter l'effet biologique final lié à l'activation de l'IGF-IR. Lorsque l'IRS-1 prédomine, les cellules tendent à proliférer et à se transformer. Lorsque Shc domine, les cellules tendent à se différencier (Valentinis B. et al., *J. Biol. Chem.*, 274:12423-12430, 1999). Il semble  
15 que la voie principalement en cause pour les effets de protection contre l'apoptose soit la voie des phosphatidylinositol 3-kinases (PI 3-kinases) (Prisco M. et al., *Horm. Metab. Res.*, 31:80-89, 1999 ; Peruzzi F. et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:166-173, 1999).

Le rôle du système IGF dans la cancérogenèse est devenu le sujet de recherches  
20 intensives dans les dix dernières années. Cet intérêt a suivi la découverte du fait qu'en plus de ses propriétés mitogéniques et anti-apoptotiques, l'IGF-IR semble être requis pour l'établissement et la maintenance d'un phénotype transformé. En fait, il a été bien établi qu'une surexpression ou une activation constitutive de l'IGF-IR conduit, dans une grande variété de cellules, à une croissance des cellules indépendante du support dans  
25 des milieux dépourvus de sérum de veau foetal, et à la formation de tumeurs chez la souris nude. Ceci n'est pas en soi une propriété unique puisqu'une grande variété de produits de gènes surexprimés peuvent transformer des cellules, incluant un bon nombre de récepteurs de facteurs de croissance. Mais la découverte cruciale qui a clairement mis en évidence le rôle majeur joué par l'IGF-IR dans la transformation a été la  
30 démonstration que les cellules R-, dans lesquelles le gène codant pour l'IGF-IR a été inactivé, sont totalement réfractaires à la transformation par différents agents qui sont

habituellement capables de transformer les cellules comme la protéine E5 du papilloma virus bovin, une surexpression de l'EGFR ou du PDGFR, l'antigène T de SV40, ras activé ou la combinaison de ces deux derniers facteurs (Sell C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:11217-11221, 1993 ; Sell C. et al., Mol. Cell. Biol., 14:3604-3612, 1994 ;  
5 Morrione A. J., Virol., 69:5300-5303, 1995 ; Coppola D. et al., Mol. Cell. Biol., 14:4588-4595, 1994 ; DeAngelis T et al., J. Cell. Physiol., 164:214-221, 1995).

L'IGF-IR est exprimé dans une grande variété de tumeurs et de lignées tumorales et les IGFs amplifient la croissance tumorale via leur fixation à l'IGF-IR. D'autres arguments en faveur du rôle de IGF-IR dans la cancérogenèse proviennent d'études  
10 utilisant des anticorps monoclonaux murins dirigés contre le récepteur ou des dominants négatifs de l'IGF-IR. En effet, des anticorps monoclonaux murins dirigés contre l'IGF-IR inhibent la prolifération de nombreuses lignées cellulaires en culture et la croissance de cellules tumorales *in vivo* (Arteaga C. et al., Cancer Res., 49:6237-6241, 1989 ; Li et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98, 1993 ; Zia F. et al., J. Cell. Biol., 24:269-  
15 275, 1996 ; Scotlandi K. et al., Cancer Res., 58:4127-4131, 1998). Il a également été montré dans les travaux de Jiang et al. (Oncogene, 18:6071-6077, 1999) qu'un dominant négatif de l'IGF-IR est capable d'inhiber la prolifération tumorale.

Selon une forme d'exécution préférée, la présente invention a pour objet un composé tel que décrit plus haut comprenant un anticorps capable de reconnaître  
20 spécifiquement et avec une forte affinité l'IGF-IR. Cet anticorps n'interagira pas ou peu avec le récepteur IR à l'insuline. Sa fixation devra inhiber *in vitro* la croissance des tumeurs exprimant l'IGF-IR en interagissant principalement avec les voies de transduction du signal activées lors des interactions IGF1/IGF-IR et IGF2/IGF-IR. Cet anticorps devra être actif *in vivo* sur tous les types de tumeurs exprimant l'IGF-IR y  
25 compris les tumeurs du sein estrogène dépendantes et les tumeurs de la prostate, ce qui n'est pas le cas pour les anticorps monoclonaux (notés AcM ou ACM) anti-IGF-IR actuellement disponibles. En effet l' $\alpha$ IR3, qui fait référence dans le domaine de l'IGF-IR, inhibe totalement la croissance de tumeurs du sein estrogène dépendantes (MCF-7) *in vitro* mais est sans effet sur le modèle correspondant *in vivo* (Arteaga C. et al., J. Clin.  
30 Invest., 84:1418-1423, 1989). De même, le fragment scFv-Fc dérivé du monoclonal murin IH7, n'est que faiblement actif sur la tumeur du sein MCF-7 et totalement inactif

sur une tumeur de la prostate androgène indépendante (Li S.L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000).

De manière surprenante, les inventeurs ont mis en évidence un anticorps chimérique (dénommé C7C10) et deux anticorps humanisés dénommés respectivement h7C10 forme humanisée 1 et h7C10 forme humanisée 2, dérivés de l'anticorps monoclonal murin 7C10, reconnaissant l'IGF-IR et répondant à tous les critères énoncés ci-dessus, c'est-à-dire à une non reconnaissance du récepteur à l'insuline, à un blocage *in vitro* de la prolifération IGF1 et/ou IGF2 induite mais également à l'inhibition *in vivo* de la croissance de différentes tumeurs exprimant l'IGF-IR parmi lesquelles un ostéosarcome et une tumeur du poumon non à petites cellules mais également et plus particulièrement la tumeur du sein estrogène dépendante MCF-7 et une tumeur de la prostate androgène indépendante DU-145. De même, et de façon surprenante, l'intensité d'inhibition de la croissance tumorale des cellules MCF-7 *in vivo* par l'anticorps 7C10 est comparable, voire significativement supérieure, à celle observée avec le tamoxifène l'un des composés de référence dans le traitement des tumeurs du sein estrogènes dépendantes. Par ailleurs, il a été montré que ces anticorps inhibent la phosphorylation de la tyrosine de la chaîne bêta de l'IGF-IR et de l'IRS1, premier substrat du récepteur. En outre, il a été également établi que ces anticorps provoquent l'internalisation dudit récepteur et sa dégradation contrairement à ce qui est habituellement observé avec les ligands naturels qui permettent le recyclage rapide du récepteur à la surface des cellules. Ces anticorps ont pu être caractérisés par leur séquence peptidique et nucléique, notamment par la séquence de leurs régions déterminant leur complémentarité (CDR) pour l'IGF-IR.

Ainsi, selon une forme d'exécution préférée, la présente invention a pour objet un composé tel que décrit plus haut comprenant un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ledit anticorps ou l'un de sesdits fragments étant capable de se lier spécifiquement au récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR et, le cas échéant, capable d'inhiber la fixation naturelle des ligands IGF1 et/ou IGF2 de IGF-IR et/ou capable d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR.

L'intérêt d'un tel composé est double.

D'une part il permet, comme décrit plus haut, d'amener directement le cytotoxique au niveau des cellules tumorales, plus particulièrement des cellules tumorales surexprimant l'IGF-IR, et ainsi de diminuer les effets secondaires au niveau des cellules saines.

5 D'autre part, son mode d'action n'est pas limité au ciblage. Le composé objet de la présente invention cumule l'action du cytotoxique qui permet de détruire les cellules tumorales et l'action de l'anticorps qui inhibera la croissance des cellules tumorales, préférentiellement des cellules tumorales exprimant l'IGF-IR, en interagissant avec les voies de transduction du signal et permettra de diminuer la résistance à l'apoptose des  
10 cellules surexprimant le récepteur à l'IGF-1 et par conséquent d'améliorer l'activité des drogues de chimiothérapie dont une part du mécanisme d'action réside en l'induction de l'apoptose.

Selon une forme de réalisation préférée du composé objet de la présente invention, l'anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une  
15 chaîne légère comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité choisie parmi les CDRs de séquence d'acide aminé SEQ ID Nos. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID Nos. 2, 4 ou 6, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR choisi parmi les  
20 CDRs de séquence d'acide aminé SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

A ce titre, la demanderesse a déposé une demande de brevet FR 02 05 753 le 7 mai 2002 sous priorité interne de la demande de brevet FR 02 00 653 déposée le 18  
25 janvier 2002 pour «Nouveaux anticorps anti-IGF-1R et leurs applications». Le contenu de ces deux demandes de brevet est incorporé ici par référence.

Dans la présente description, les termes polypeptides, séquences polypeptidiques, peptides et protéines attachés aux composés anticorps ou à leur séquence sont interchangeables.

30 Il doit être compris ici que l'invention ne concerne pas les anticorps sous forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils

ont pu être isolés ou obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou par synthèse chimique, et qu'ils peuvent alors comporter des acides aminés non naturels comme cela sera décrit plus loin.

Par région CDR ou CDR, on entend désigner les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines comme définies par Kabat et al. (Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5<sup>th</sup> Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Il existe 3 CDRs de chaîne lourde et 3 CDRs de chaîne légère. Le terme CDR ou CDRs est utilisé ici pour désigner suivant les cas, l'une de ces régions ou plusieurs, voire l'ensemble, de ces régions qui contiennent la majorité des résidus d'acide aminés responsables de la liaison par affinité de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope qu'il reconnaît.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement (alignement optimal), ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison pouvant être réalisée par segment ou par «fenêtre de comparaison». L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acide nucléique ou d'acide aminé à comparer peut



comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences » (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap penaltie » : 5, et « extension gap penaltie » : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

Par séquence d'acide aminé présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité avec une séquences d'acide aminé de référence, on préfère celles présentant par rapport à la séquence de référence, certaines modifications, en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation ou un allongement. Dans le cas d'une substitution, d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s) consécutif(s) ou non consécutif(s), on préfère les substitutions dans lesquelles les acides aminés substitués sont remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression « acides aminés équivalents » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier essentiellement les activités biologiques des anticorps correspondants et telles qu'elles seront définies par la suite, notamment dans les exemples.

Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur des résultats d'essais comparatifs d'activité biologique entre les différents anticorps susceptibles d'être effectués.



A titre d'exemple, on mentionne les possibilités de substitution susceptibles d'être effectuées sans qu'il résulte en une modification approfondie de l'activité biologique de l'anticorps modifié correspondant. On peut remplacer ainsi la leucine par la valine ou l'isoleucine, l'acide aspartique par l'acide glutamine, la glutamine par l'asparagine, l'arginine par la lysine, etc., les substitutions inverses étant naturellement  
5 envisageables dans les mêmes conditions.

Les anticorps selon la présente invention sont de préférence des anticorps monoclonaux spécifiques, notamment d'origine murine, chimériques ou humanisés qui pourront être obtenus selon les méthodes standards bien connues de l'homme de l'art.

10 En général, pour la préparation d'anticorps monoclonaux ou leurs fragments fonctionnels, notamment d'origine murine, on pourra se référer aux techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel « Antibodies » (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) ou à la technique de préparation à partir d'hybridomes décrite par Kohler et  
15 Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Sont également compris par anticorps selon la présente invention, les anticorps chimériques ou humanisés.

Par anticorps chimérique, on entend désigner un anticorps qui contient une région variable (chaîne légère et chaîne lourde) naturelle dérivée d'un anticorps d'une  
20 espèce donnée en association avec les régions constantes de chaîne légère et chaîne lourde d'un anticorps d'une espèce hétérologue à ladite espèce donnée.

Les anticorps ou leurs fragments de type chimérique selon l'invention peuvent être préparés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par anticorps humanisés, on entend désigner un anticorps qui contient des régions CDRs dérivées  
25 d'un anticorps d'origine non humaine, les autres parties de la molécule d'anticorps étant dérivée d'un (ou de plusieurs) anticorps humains. En outre, certains des résidus des segments du squelette (dénommés FR) peuvent être modifiés pour conserver l'affinité de liaison (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986 ; Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536, 1988 ; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988).

30 Les anticorps humanisés selon l'invention ou leurs fragments peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art (comme par exemple celles



décrites dans les documents Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992 ; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 ; ou Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). De tels anticorps humanisés selon l'invention sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes de diagnostic *in vitro*, ou de traitement prophylactique et/ou thérapeutique *in vivo*.

Par fragment fonctionnel d'un anticorps selon l'invention, on entend désigner en particulier un fragment d'anticorps, tel que des fragments Fv, scFv (sc pour simple chaîne), Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc ou diabodies, ou tout fragment dont la durée de demie-vie aurait été augmentée par modification chimique, comme l'ajout de poly(alkylène) glycol tel que le poly(éthylène)glycol ("PEGylation"), ou par incorporation dans un liposome, lesdits fragments présentant au moins un des CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4, 6, 8, 10 ou 12 caractéristiques selon l'invention, et, notamment, en ce qu'il est capable d'exercer de manière générale une activité même partielle de l'anticorps dont il est issu, telle qu'en particulier la capacité à reconnaître et à se lier au récepteur IGF-IR, et, le cas échéant, à inhiber l'activité du récepteur IGF-IR.

De préférence, lesdits fragments fonctionnels seront constitués ou comprendront une séquence partielle de la chaîne variable lourde ou légère de l'anticorps dont ils sont dérivés, ladite séquence partielle étant suffisante pour retenir la même spécificité de liaison que l'anticorps dont elle est issue et une affinité suffisante, de préférence au moins égale à 1/100, de manière plus préférée à au moins 1/10 de celle de l'anticorps dont elle est issue, vis-à-vis du récepteur IGF-IR.

Un tel fragment fonctionnel comportera au minimum 5 acides aminés, de préférence 10, 15, 25, 50 et 100 acides aminés consécutifs de la séquence de l'anticorps dont il est issu.

De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, F(ab'), scFv-Fc ou diabodies, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps dont ils sont issus. Selon la présente invention, des fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfure par réduction chimique. D'une autre manière les fragments d'anticorps compris dans la présente invention

peuvent être obtenus par des techniques de recombinaisons génétiques bien connues également de l'homme de l'art ou encore par synthèse peptidique au moyen par exemple de synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc..

5 De manière plus préférée, l'invention comprend les composés comprenant au moins un anticorps, ou un fragment fonctionnel, notamment chimérique ou humanisé, obtenu par recombinaison génétique ou par synthèse chimique.

Selon une autre forme de réalisation préférée du composé objet de la présente invention, l'anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments fonctionnels, selon  
10 l'invention comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR de séquence SEQ ID No. 12 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 12.

Parmi les six courtes séquences de CDR, le troisième CDR de la chaîne lourde (CDRH3) a une plus grande variabilité de taille (grande diversité essentiellement due  
15 aux mécanismes d'arrangement des gènes qui lui donnent naissance). Il peut être aussi court que 2 acides aminés alors que la taille la plus longue connue est de 26. Fonctionnellement, le CDRH3 joue un rôle à part dans la détermination de la spécificité de l'anticorps (Segal et al., PNAS, 71:4298-4302, 1974 ; Amit et al., Science, 233:747-753, 1986 ; Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987 ; Chothia et al., Nature,  
20 342:877-883, 1989 ; Caton et al., J. Immunol., 144:1965-1968, 1990 ; Sharon et al., PNAS, 87:4814-4817, 1990 ; Sharon et al., J. Immunol., 144:4863-4869, 1990 ; Kabat et al., J. Immunol., 147:1709-1719, 1991).

Il est connu que seul un faible pourcentage des acides aminés des CDRs contribue à la construction de site de liaison de l'anticorps, mais ces résidus doivent être  
25 maintenus dans une conformation tridimensionnelle très spécifique.

Selon une forme de réalisation plus préférée du composé objet de la présente invention, l'anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments fonctionnels, selon l'invention comprend une chaîne lourde comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins deux de trois CDRs  
30 ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.



Selon une forme de réalisation encore plus préférée du composé objet de la présente invention, l'anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments fonctionnels, selon l'invention comprend une chaîne légère comprenant au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6.

Selon encore une autre forme de réalisation préférée du composé objet de la présente invention, l'anticorps monoclonal ou l'un de ses fragments fonctionnels selon l'invention, comprend une chaîne légère comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

De manière la plus préférée, l'anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels utilisés dans l'invention, comprend une chaîne lourde comprenant les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12 et en ce qu'il comprend en outre une chaîne légère comprenant les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet un composé comprenant un anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, qui ne se fixe pas ou qui ne se fixe pas de manière significative au récepteur humain IR de l'insuline.

De manière préférée, lesdits fragments fonctionnels selon la présente invention seront choisis parmi les fragments Fv, scFv, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fab', scFv-Fc ou diabodies, ou tout fragment fonctionnel dont la demi-vie aurait été augmentée par une modification chimique, notamment par PEGylation, ou par l'incorporation dans un liposome.

Sous un autre aspect, l'invention est relative à un composé comprenant un anticorps monoclonal, ledit anticorps monoclonal étant sécrété par l'hybridome murin tel que déposé au Centre National de Culture de Microorganisme (CNCM) (Institut Pasteur, Paris, France) le 19 septembre 2001 sous le numéro I-2717.

Dans un mode de réalisation particulier du composé objet de la présente invention ledit anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 54, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimale avec la  
5 séquence SEQ ID No. 54, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 69, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 69.

Sous un aspect également particulier du composé objet de la présente invention ledit anticorps monoclonal est un anticorps chimérique et comprend en outre les régions  
10 constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps d'une espèce hétérologue à la souris, notamment de l'Homme, et de manière préférée, en ce que les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain sont respectivement la région kappa, lambda et, gamma-1, gamma-2 ou gamma-4.

Sous un autre aspect particulier du composé objet de la présente invention ledit  
15 anticorps monoclonal est un anticorps humanisé et comprend une chaîne légère et/ou une chaîne lourde dans lesquelles les segments de squelette FR1 à FR4 de ladite chaîne légère et/ou chaîne lourde sont dérivés respectivement de segments de squelette FR1 à FR4 de chaîne légère et/ou de chaîne lourde d'anticorps humains.

Par segment de squelette FR1 à FR4, il faut comprendre les segments issus des  
20 régions charnières (ou frameworks).

Selon un mode de réalisation préféré du composé objet de la présente invention, l'anticorps humanisé, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 61 ou 65, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID  
25 No. 61 ou 65, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 75, 79 ou 83, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 75, 79 ou 83.

De préférence, l'anticorps humanisé couplé, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ  
30 ID No. 65, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 79 ou 83, de préférence SEQ ID No. 83.

Selon une autre forme d'exécution du composé objet de la présente invention l'anticorps monoclonal tel que décrit plus haut est, en outre, capable de se lier spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR et/ou capable d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.

5 De manière générale, les facteurs de croissance sont de petites protéines impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules normales. Certains de ces facteurs de croissance jouent également un rôle important dans l'initiation et la maintenance de la transformation cellulaire, pouvant fonctionner comme facteurs autocrines ou paracrines. C'est notamment le cas, outre de l'IGF1 décrit  
10 plus haut, du facteur de croissance de l'épiderme EGF (EGF pour " Epidermal Growth Factor ") qui semble particulièrement impliqué dans l'apparition du phénotype tumoral, la progression des tumeurs et la génération des métastases.

L'EGF et l'IGF1 exercent leur action par l'intermédiaire de leur récepteur respectif dénommé ici EGFR et IGF-IR. Il s'agit dans les deux cas de récepteurs  
15 membranaires à activité tyrosine kinase dont la surexpression est décrite dans de nombreux cancers. Il faut cependant noter que l'interaction de ces deux récepteurs n'est pas clairement établie et que les études effectuées par diverses équipes à ce propos donnent des résultats contradictoires quant à la collaboration de ces deux récepteurs.

Des travaux effectués sur des cellules de tumeurs de la prostate montrent que  
20 l'interruption de la boucle autocrine EGF/EGFR par un anticorps monoclonal (dénommé ici "ACM" ou "AcM") anti-EGFR se traduit par une perte complète de la réponse des cellules DU145 à l'IGF1 (Connolly J.M. and Rose D.P., Prostate, Apr. 24(4):167-75, 1994 ; Putz T. et al., Cancer Res., Jan. 1, 59(1):227-33, 1999). Ces résultats suggéreraient qu'un blocage du récepteur à l'EGF serait suffisant pour obtenir  
25 une inhibition totale des signaux de transformation générés par l'activation des deux récepteurs (EGFR et IGF-IR). En revanche, d'autres études (Pietrkowski et al., Cell Growth Differ, Apr., 3(4):199-205, 1992 ; Coppola et al., Mol Cell Biol., Jul., 14(7):4588-95, 1994) ont montré qu'une surexpression de l'EGFR nécessite la présence d'un IGF-IR fonctionnel pour exercer son potentiel mitogénique et transformant, alors  
30 que l'IGF-IR ne nécessite pas, pour sa part, la présence d'EGFR fonctionnel pour médier son action. Cette seconde série d'études serait plus en accord avec une stratégie

tendant à bloquer préférentiellement l'IGF-IR dans le but d'atteindre simultanément les deux récepteurs.

De manière surprenante, les inventeurs ont, dans un premier temps, mis ainsi en évidence qu'une co-inhibition de la fixation de l'IGF1 et/ou IGF2 sur le récepteur IGF-IR et de la fixation de l'EGF sur le récepteur EGFR permettait d'obtenir une synergie d'action significative de ces deux actions contre la croissance tumorale *in vivo* chez des souris nude porteuses d'une tumeur exprimant ces deux récepteurs. Une des hypothèses les plus probables pouvant expliquer cette synergie d'action est que les deux facteurs de croissance EGF et IGF1 (et/ou IGF2) agissent eux-mêmes en synergie dans la transformation de cellules normales en cellules à caractère tumoral et/ou dans la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales pour certaines tumeurs, notamment pour celles surexprimant les deux récepteurs EGFR et IGF-IR et/ou présentant une suractivation du signal de transduction médié par ces deux récepteurs, en particulier au niveau de l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs.

Selon un aspect préféré de cette forme d'exécution du composé, l'anticorps monoclonal couplé consiste en un anticorps bispécifique comprenant un second motif inhibant spécifiquement la fixation de l'EGF sur l'EGFR et/ou inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.

Les anticorps bispécifiques ou bifonctionnels constituent une seconde génération d'anticorps monoclonaux dans lesquels deux régions variables différentes sont combinées dans la même molécule (Hollinger and Bohlen, 1999, Cancer and metastasis rev., 18:411-419). Ces anticorps peuvent être obtenus par des méthodes chimiques (Glennie M.J. et al., 1987, J. Immunol., 139:2367-2375 ; Repp R. et al., 1995, J. Hemat. 377-382) ou somatiques (Staerz U.D. and Bevan M.J., 1986, PNAS 83, 1453-1457 ; Suresh M.R., et al., 1986, Method Enzymol., 121:210-228) mais également et préférentiellement par des techniques d'ingénierie génétique qui permettent de forcer l'hétérodimérisation et facilitent ainsi le procédé de purification de l'anticorps recherché (Merchand et al., 1998, Nature Biotech., 16:677-681).

Ces anticorps bispécifiques peuvent être construits comme des IgG entières, comme des (Fab')<sub>2</sub> bispécifiques, comme des Fab'PEG ou comme des diabodies ou encore comme des scFv bispécifiques mais également comme un anticorps bispécifique

tétravalent ou deux sites de fixation sont présents pour chaque antigène ciblé (Park et al., 2000, Mol. Immunol., 37(18):1123-30) ou ses fragments comme décrit plus haut.

Dans une forme de réalisation préférée de l'invention, l'anticorps bispécifique utilisé est un anticorps bivalent ou tétravalent.

5 Dans la pratique, l'intérêt d'utiliser un anticorps bispécifique tétravalent est qu'il présente une avidité plus importante par rapport à un anticorps bivalent du fait de la présence de deux sites de fixation pour chaque cible, respectivement IGF-IR et EGFR dans la présente invention.

10 A titre d'exemple non limitatif, le second motif est sélectionné parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fab', Fab'PEG, scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demi-vie aurait été augmentée.

Un autre aspect de l'invention concerne le mode de couplage entre l'anticorps et l'agent cytotoxique. Quelle que soit la nature du couplage, direct ou non, stable ou labile, celui-ci ne devra en aucun cas altérer les fonctions biologiques respectives de l'anticorps et de l'agent cytotoxique. Il est bien entendu que tout couplage répondant à  
15 cette caractéristique, et connu de l'homme de l'art, est compris dans l'étendue de la présente demande de brevet. En outre, le couplage et, plus particulièrement le lien utilisé, devra permettre la libération de la déoxyvinblastine, sous la forme 4-déacétylée ou 3-acide ou 4-déacétylée et 3-acide ou de l'une de ces formes portant tout ou partie  
20 dudit lien utilisé, au niveau des cellules cibles.

Selon une forme de réalisation préférée, le couplage est un couplage chimique. Plus particulièrement, ledit couplage chimique se compose d'un ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca*, d'un ancrage sur l'anticorps et d'un lien reliant ces deux ancrages.

Par lien, il faut comprendre toute structure capable d'assurer une liaison de  
25 quelle que nature que ce soit entre les deux éléments du composé, à savoir une molécule chimique et un anticorps.

Au niveau de l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca*, plusieurs possibilités sont envisagées. On peut citer, par exemple, un ancrage sur la fonction alcool en position 4 après déacétylation du groupement 4-acétoxy dudit alcaloïde de *Vinca*.



Dans une autre forme d'exécution, l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé sur la fonction acide en position 3 après déacétylation du groupement 4-acétoxy et déméthylation de la fonction ester en position 3 dudit alcaloïde de *Vinca*.

Selon encore une autre forme d'exécution de l'invention, l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé sur la fonction acide en position 3 directement par réaction sur la fonction ester en position 3 dudit alcaloïde de *Vinca*.

Selon encore une autre forme d'exécution de l'invention, l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé par une fonction ester ou thio-ester sur la fonction hydroxyle en position 3.

Une forme de réalisation supplémentaire consiste à réaliser l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* par une fonction amide ou une fonction ester ou une fonction hydrazide sur la fonction acide en position 4.

Pour ce qui est de l'ancrage au niveau de l'anticorps, celui-ci ne doit aucunement dénaturer l'anticorps afin de ne pas diminuer ses capacités de reconnaissance et d'interaction avec les cellules tumorales.

Pour ce faire, il est préféré que l'ancrage sur l'anticorps soit réalisé sur les oligosaccharides, les lysines et/ou les résidus d'acides aspartique et glutamique.

L'alcaloïde de *Vinca* peut aussi être couplé sur les fonctions carboxyliques de l'anticorps portées par les résidus acides aspartique et glutamique de l'anticorps. Par exemple, un dérivé amine, hydrazide ou hydrazine de l'alcaloïde de *Vinca* sera couplé sur ces résidus en présence d'un composé de type carbodiimide tel que le N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide (ou EDAC).

En pratique, il est encore plus préféré d'effectuer l'ancrage au niveau des oligosaccharides présents sur l'anticorps. En effet, il n'y a pas d'oligosaccharides au niveau des sites de reconnaissance de l'anticorps et, de ce fait, aucun risque d'altérer les capacités de reconnaissance / activité biologique dudit anticorps. Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, l'ancrage est effectué sur les oligosaccharides présents au niveau des asparagines (Asn) suivies d'une séquence consensus constitué d'un acide aminé et d'une Sérine ou d'une Thréonine. Par exemple, sans aucune limitation, un ancrage préféré sur l'anticorps IgG1 utilisé dans l'invention est au niveau de l'Asn297.



Il est également couvert un ancrage panaché, c'est-à-dire sur des oligosaccharides, des lysines et/ou des acides aspartique et glutamique.

Une forme de réalisation supplémentaire consiste à augmenter fortement la densité de l'alcaloïde de *Vinca* afin d'atteindre un nombre de 10 à 50 moles par mole d'anticorps. On peut citer le couplage d'un dérivé hémisuccinate de l'alcaloïde de *Vinca* sur un polymère de lysine (Poly-L-Lys ou Poly-D-Lys). Le conjugué ainsi obtenu est ensuite couplé sur les oligosaccharides de l'anticorps préalablement oxydés à l'aide de métapériodate.

Dans une autre forme d'exécution, un dérivé hydrazide de l'alcaloïde de *Vinca* peut être couplé sur un dextran préalablement oxydé à l'aide de métapériodate. Le conjugué obtenu est ensuite couplé à l'anticorps via les résidus lysine.

Selon encore une autre forme d'exécution, un dérivé hémisuccinate de l'alcaloïde de *Vinca* peut être couplé sur un dextran préalablement activé par oxydation ménagée à l'aide de métapériodate puis substitué par un composé de type diamide. Le conjugué obtenu est alors couplé sur les résidus lysine de l'anticorps.

Selon une forme d'exécution préférée de l'invention, l'ancrage sur l'anticorps est réalisé par réaction d'une fonction amine, d'une fonction hydrazine, d'une fonction hydrazide ou d'une fonction acide activée.

Plus particulièrement, l'ancrage sur l'anticorps est réalisé par réaction d'une fonction époxyde ou d'une fonction disulfure, d'une fonction sulfure ou d'une fonction acide activée avec un résidu azoté ou avec un résidu hydroxylé ou avec un résidu thiol dudit anticorps.

On peut également citer, de manière non limitative, d'autres liens pouvant aussi être utilisés pour lier de manière covalente les *Vinca*-alcaloïdes aux anticorps ou à leurs fragments fonctionnels (Garnett et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2001, 171-216), comme des aldéhydes qui permettent de former des bases de Schiff, qui peuvent ensuite être stabilisées par réduction au borohydrure ou au cyanoborohydrure de sodium ; des disulfures qui présentent l'avantage de pouvoir libérer le *Vinca*-alcaloïdes à l'intérieur de la cellule tumorale grâce à l'environnement réducteur intra-cytoplasmique ; des thioéthers plus stables ; des thioesters plus labiles ; des liens labiles en milieu acide qui présentent l'avantage de permettre la libération du cytotoxique dans la tumeur

généralement plus acide ou durant le passage de l'endosome (pH 6.0-6.8) vers le lysosome (pH 4.5-5.5) ou encore des liens dégradables par des enzymes, qui présentent l'avantage d'être stables dans le sérum et de libérer le cytotoxique dans le milieu intracellulaire de la cellule tumorale.

5 On peut également citer des séquences peptidiques de type Ala-Leu qui peuvent être clivées par des hydrolases lysosomales (Masquelier et al., J. Med. Chem., 1980, 23:1166-1170) ou encore des liens de type hydrazone comme ceux utilisés dans l'immunoconjugué gemtuzumab ozogamicin utilisé dans le traitement de certaines leucémies et commercialisé sous le nom de Mylotarg (Hamann et al., Bioconjugate  
10 Chem., 2002, 13:47).

Comme décrit plus haut, une forme préférée de l'invention utilise un lien permettant la libération de la déoxyvinblastine au niveau des cellules tumorales.

Un premier moyen d'y parvenir consiste à utiliser un lien reliant les deux  
15 ancrages constitué d'une chaîne peptidique. En effet, un tel lien peptidique sera dégradé/hydrolysé au niveau des cellules ciblées par les enzymes des endosomes et des lysosomes.

Selon une autre forme de réalisation de l'invention, le lien reliant les deux  
20 ancrages est constitué d'une chaîne carbonée, linéaire ou ramifiée. Dans ce dernier cas, il est envisagé que un ou plusieurs groupements aromatiques, éthyléniques ou acétyléniques ainsi qu'une ou plusieurs fonctions cétone, amide, ester, hydrazide, hydrazone, amine, éther, sulfure, disulfure sont inclus dans la chaîne carbone de façon distincte ou combinée. Par exemple, dans le cas d'une liaison via un pont disulfure, c'est le milieu réducteur qui permettra la rupture du lien et la libération de la déoxyvinblastine.

25 Dans tous les cas, seul le lien est détruit pour libérer le principe actif, ledit principe actif et l'anticorps restant, quant à eux, intègres.

Selon encore une autre forme de réalisation, il n'y a pas de lien mais l'alcaloïde de *Vinca* est couplé directement avec un résidu azoté ou avec un résidu hydroxylé ou avec un résidu thiol de l'anticorps.

30 L'intérêt d'un tel couplage direct réside dans l'absence de lien d'ancrage et, par conséquent, dans l'absence de réaction immunitaire du patient contre ce lien. On évite



ainsi, par exemple, l'apparition d'anticorps anti-lien secrétés par l'organisme en réponse à l'intrusion dudit lien.

Plus particulièrement, le composé selon l'invention est caractérisé en ce que la fonction acide en position 4 de l'alcaloïde de *Vinca* est couplée, par l'intermédiaire d'une  
5 fonction hydrazide, avec un résidu aldéhydique de l'anticorps préalablement généré.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif un composé consistant en un alcaloïde de *Vinca* couplé à un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, selon l'invention, de préférence additionné d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

10 La présente invention comprend en outre l'utilisation du composé selon l'invention pour la préparation d'un médicament.

Plus particulièrement, selon une autre forme d'exécution, l'invention concerne l'utilisation d'un composé tel que décrit plus haut et/ou d'une composition comprenant un tel composé pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au  
15 traitement de cancers, notamment induits par une surexpression et/ou une activation anormale du récepteur IGF-IR et/ou EGFR, et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l-IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR et/ou de l'EGF avec l'EGFR.

Parmi les cancers qui peuvent être prévenus et/ou traités, on préfère le cancer de  
20 la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre ou le cancer du côlon ou tout autre cancer surexprimant IGF-IR.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-  
25 après ainsi que des exemples compris dans la demande de brevet FR 02 05753 déposée par la Demanderesse le 7 mai 2002 sous priorité interne de la demande de brevet FR 02 00 653 déposée le 18 janvier 2002 pour «Nouveaux anticorps anti-IGF-IR et leurs applications», ainsi que des exemples compris dans la demande de brevet FR 02 00 654 déposée le 18 Janvier 2002 pour « Nouvelles compositions à activité anti-IGF-IR et anti-  
30 EGFR et leurs applications ».

## LEGENDES DES FIGURES

Les figures 1 et 2 illustrent l'activité comparée de l'anticorps murin 7C10 et de sa forme humanisée h7C10 sur la croissance respectivement des cellules A549 et MCF-7 chez la souris nude.

5 Les figures 3 et 4 illustrent l'activité antitumorale de la déoxyvinblastine *in vivo* sur le modèle de leucémie murine P388.

La figure 5 illustre l'activité antitumorale de conjugués anticorps anti-IGF-1R-*Vinca* alcaloïde sur le modèle de tumeur du poumon non à petites cellules A549 chez la souris nude.

10

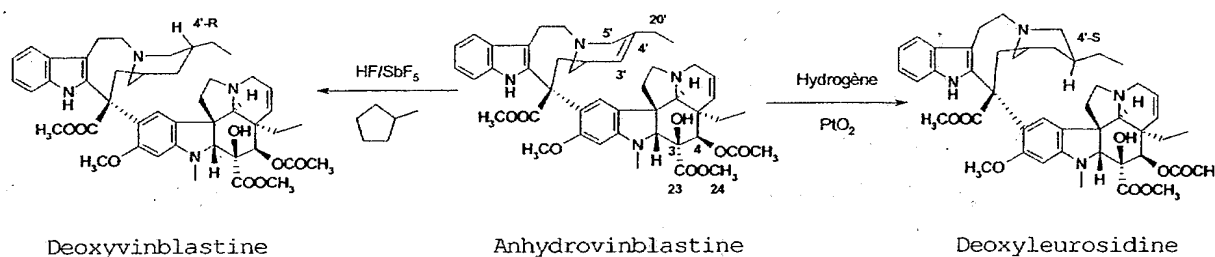
## MATERIEL ET METHODE

**Exemple 1 : Obtention de la déoxyvinblastine**

La déoxyvinblastine 4'-R (structure voir schéma 1) est obtenue par réduction ionique de l'anhydrovinblastine selon un procédé connu de l'homme de l'art (Lafitte C et al., Tetrahedron Letters, 1998, volume 39, pp 8281-8282).

La déoxyvinblastine 4'-S ou déoxyleurosidine 4'-S est obtenue par hydrogénation catalytique de l'anhydrovinblastine selon la technique également connue de l'homme de l'art (De-Bruyn A. et al., Bulletin de la Société Chimique Belge de 1983, Volume 92, numéro 5, pp 485-494).

20

Schéma 1**Exemple 2 : Déacétylation des alcaloïdes dimères de *Vinca***

La déoxyvinblastine ou la déoxyleurosidine est dissoute et agitée pendant 4 heures à 50°C dans 30 ml de méthanol contenant 1,2 équivalents de méthylate de sodium. Cette solution est alors versée dans l'eau glacée pour précipiter le composé

formé. Après filtration, lavage à l'eau et séchage sous vide à 40°C on obtient la 4-déacétyldéoxyvinblastine ou la 4-déacétyldéoxy-leurosidine d'une pureté supérieure à 95 %.

5    **Exemple 3 : Couplage direct de la 4'-déoxyvinblastine (4'-R) ou la 4'-déoxyleurosidine (4'-S) par réaction d'une fonction 4-carboxyhydrazide sur les anticorps anti-IGF-1R préalablement oxydés**

La 4'-déoxyvinblastine ou la 4'-déoxyleurosidine est traitée par l'hydrazine anhydre en solution dans le méthanol et à température ambiante. La réaction est suivie  
10 par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) Analytique, et quand 95 % de l'alcaloïde de départ a réagi, le milieu réactionnel est traité par l'eau afin que la 4'-déoxyvinblastine-3-déacétyl-4-carbohydrazide ou la 4'-déoxyleurosidine-3-déacétyl-4-carbohydrazide soit séparée par filtration.

Après chromatographie sur gel de silice puis cristallisation, la 4'-  
15 déoxyvinblastine-3-déacétyl-4-carbohydrazide ou la 4'-déoxyleurosidine-3-déacétyl-4-carbohydrazide a une pureté supérieure à 96 %.

L'anticorps anti-IGF-1R est oxydé à froid dans un tampon acétate de sodium par traitement au métapériodate de sodium. Après chromatographie d'exclusion, l'anticorps anti-IGF-1R oxydé, en solution dans un tampon acétate, est traité à froid par la 4'-  
20 déoxyvinblastine-3-déacétyl-4-carbohydrazide ou la 4'-déoxyleurosidine-3-déacétyl-4-carbohydrazide.

L'immunoconjugué ainsi obtenu est séparé de l'alcaloïde de *Vinca* résiduel non conjugué et purifié par chromatographie d'exclusion avec un tampon phosphate à pH 7,4 puis dialyse intensive. L'absence d'alcaloïde de *Vinca* libre est vérifiée par HPLC  
25 analytique.

L'immunoconjugué est caractérisé sur gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE (bleu de Coomassie et/ou nitrate d'argent), par chromatographie d'exclusion (SEC, UV à 280 nm) et par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. La cartographie des sites de couplage est réalisée par analyse par chromatographie liquide couplée à la  
30 spectrométrie de masse (LC-MS) suite à une digestion enzymatique (trypsine et PNGase F) (Laguzza et al., J. MED. CHEM., 1989, 32:548).

**Exemple 4 : Couplage de la 4'-déoxyvinblastine (4'-R) ou la 4'-déoxyleurosidine (4'-S) sur les anticorps anti-IGF-1R par l'intermédiaire de l'anhydride succinique**

La 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou la 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine est traitée par l'anhydride succinique dans la pyridine pendant 24 heures à 20°C. La réaction est suivie par HPLC analytique, et quand 95 % de l'alcaloïde de départ a réagi, le milieu réactionnel est traité par l'eau afin de précipiter l'hémisuccinate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou l'hémisuccinate de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine. Après filtration et séchage le composé est purifié par HPLC préparative en phase inverse en utilisant de la silice greffée C18 et un éluant composé d'acétonitrile, de méthanol et de tampon acétate d'ammonium.

L'hémisuccinate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou l'hémisuccinate de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine est traité par l'hydroxybenzotriazole et la dicyclohexylcarbodiimide dans le diméthylformamide à température ambiante pendant 24 heures et en présence d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine. Après filtration, la solution est mélangée à l'anticorps monoclonal anti-IGF-1R à pH 8,6 pendant 4 heures. L'immunoconjugué est séparé du *Vinca*-alcaloïde non conjugué par chromatographie d'exclusion avec un tampon phosphate à pH 7,4. Une dialyse intensive permet d'éliminer le *Vinca*-alcaloïde non conjugué. L'immunoconjugué est caractérisé par gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE, par chromatographie d'exclusion et par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. La cartographie des sites de couplage est réalisée par analyse par chromatographie liquide couplé à la spectrométrie de masse (LC-MS) suite à une digestion enzymatique (trypsine) par rapport à une carte tryptique de référence obtenue pour l'anticorps monoclonal non dérivé. (Schneck et al., Clin. Pharmacol. Ther., 1990, 47:36 ; Rowland et al., Cancer. Immunol. Immunother., 1985, 19:1).

**Exemple 5 : Couplage de la 4'-déoxyvinblastine (4'-R) ou la 4'-déoxyleurosidine (4'-S) sur un résidu azoté des anticorps anti-IGF-1R par l'intermédiaire d'un pont disulfure inclus dans le lien**

La 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou la 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine est traitée dans le chlorure de méthylène à température ambiante pendant 24 heures, en présence



d'une quantité catalytique de diméthylaminopyridine, par un large excès d'acide 3-méthylsulfonylpropanoïque et un large excès de dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu réactionnel est traité de façon classique puis le 3-méthylsulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou le 3-méthylsulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-  
5 déoxyleurosine est purifié par HPLC préparative en phase inverse en utilisant de la silice greffée C18 et un éluant composé d'acétonitrile, de méthanol et de tampon acétate d'ammonium.

Le 3-méthylsulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou le 3-méthylsulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosine est traité par le  
10 dithiothreitol dans un mélange d'eau et de méthanol pour obtenir le 3-sulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou le 3-sulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosine qui est purifié par HPLC préparative en phase inverse en utilisant de la silice greffée C18 et un éluant composé d'acétonitrile, de méthanol et de tampon acétate d'ammonium.

15 L'anticorps anti-IGF-1R est dérivé avec du N-succinimidyl-4-(2-pyridyldithio)propanoate (dont la dénomination commerciale est SPDP) dans un tampon phosphate de potassium 50 mM pH 6,5, NaCl 50 mM et EDTA 2 mM pendant 90 minutes. A cette solution d'anticorps ainsi dérivé, on ajoute le 3-sulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou le 3-sulfonylpropanoate de 3-déacétyl-4'-  
20 déoxyleurosine dissous dans le minimum de DMSO. Après 24 heures de contact, l'immunoconjugué est isolé par chromatographie d'exclusion et est caractérisé sur gel d'électrophorèse de type SDS-PAGE, par chromatographie d'exclusion et par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Ojima et al., J. Med. Chem., 2002, 45:5320).

25

**Exemple 6 : Couplage de la 4'-déoxyvinblastine (4'-R) ou la 4'-déoxyleurosine (4'-S) sur les anticorps anti-IGF-1R par l'intermédiaire d'une fonction hydrazide terminale portée par un lien relié à l'alcaloïde de *Vinca***

La 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou la 3-déacétyl-4'-déoxyleurosine est traitée  
30 dans le chlorure de méthylène à température ambiante pendant 24 heures, en présence d'une quantité catalytique de diméthylamino pyridine, par un excès de mono ester



méthylque de l'acide 1,6-hexanedicarboxylique et un excès de dicyclohexylcarbodiimide. Le milieu réactionnel est traité de façon classique puis le 3-méthoxycarbonylpentanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine est purifié par HPLC préparative en phase inverse en utilisant de la  
5 silice greffée C18 et un éluant composé d'acétonitrile, de méthanol et de tampon acétate d'ammonium.

Le 3-méthoxycarbonylpentanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine est traité par défaut avec l'hydrazine anhydre en solution dans le méthanol à température ambiante. La réaction est suivie par HPLC Analytique,  
10 et quand 70 % de l'alkaloïde de départ a réagi, le milieu réactionnel est évaporé et le 3-hydrazinocarbonylpentanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine est purifié par HPLC préparative en phase inverse en utilisant de la silice greffée C18 et un éluant composé d'acétonitrile, de méthanol et de tampon acétate d'ammonium.

15 L'oxydation de l'anticorps anti-IGF-1R, le couplage avec le 3-hydrazinocarbonylpentanoate de 3-déacétyl-4'-déoxyvinblastine ou de 3-déacétyl-4'-déoxyleurosidine, la purification et l'identification sont réalisés selon les mêmes techniques que celles décrites dans l'exemple 3.

#### 20 **Exemple 7 : Activité comparée *in vivo* des anticorps 7C10 et h7C10 sur les modèles A549 et MCF-7**

Afin de confirmer l'activité de l'anticorps humanisé h7C10 *in vivo*, ce dernier a été comparé au 7C10 dans le modèle de tumeur du sein œstrogène dépendant MCF-7 et dans le modèle de tumeur du poumon non à petites cellules A549.

25 Pour ce faire,  $5.10^6$  cellules A549 ont été implantées en sc (sous-cutanée) chez des souris nude. Cinq jours après cette implantation, les tumeurs sont mesurées et des groupes de 6 souris constitués. Ces groupes sont respectivement traités avec 1) l'anticorps 7C10 injecté en ip (intra péritonéal) à raison de 125 µg/dose deux fois par semaine ; 2) l'anticorps h7C10 injecté dans les mêmes conditions que sa forme murine ;  
30 3) du PBS (il a été préalablement montré que des isotypes contrôles murins et humains ne modifient pas le profil de croissance des tumeurs par rapport à un traitement des



animaux avec du PBS). Dans le modèle de tumeur de sein MCF-7, un granule d'oestradiol à libération prolongée (0,72 mg/comprimé libéré sur 60 jours) est implanté en s.c. 24 heures avant l'implantation des cellules. Ce granule est indispensable à l'établissement de toute tumeur humaine E2 dépendante chez cette espèce animale.

5 Les figures 1 et 2 montrent, comme attendu, qu'une inhibition significative de la croissance tumorale est observée avec l'anticorps murin 7C10. Concernant l'anticorps humanisé h7C10, l'activité observée est exactement de la même intensité que celle observée avec sa contrepartie murine et ce quel que soit le modèle utilisé. Cette donnée indique que l'humanisation n'a pas modifié les propriétés de l'anticorps généré.

10

**Exemple 8 : Mise en évidence des activités comparées de la vinblastine, de la vincristine, de la 4'-S déoxyvinblastine et de la 4'-R déoxyleurosidine**

L'activité supérieure de la déoxyvinblastine (4'-R) et de la déoxyleurosidine (4'-S) a été mise en évidence *in vivo* contre la leucémie murine P388 greffée par voie intraveineuse et comparée à l'activité de la vinblastine et de la vincristine testées dans  
15 les mêmes conditions. Le protocole de ce test est décrit par Kruczynski A. et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1998, volume 41, pages 437 à 447.

Pour ce faire, un total de  $10^6$  cellules de leucémie murine P388 ont été implantées en i.v. chez des souris CDF1 au jour 0. Après randomisation des animaux en cages traitements par chaque alcaloïde et cage témoins, les composés sont administrés  
20 au jour 1 par voie i.p..

Classiquement, l'activité *in vivo* des composés est exprimée par l'augmentation du temps de survie. Ce temps de survie est exprimé par le T/C à une dose exprimée en mg par kg (mg/kg). Le T/C correspond au rapport, multiplié par 100, de la médiane du temps de survie des animaux traités sur la médiane du temps de survie des animaux  
25 contrôles. En accord avec les critères standard du NCI, un T/C de 120 correspond à un niveau minimum pour conclure à l'activité.

Un T/C compris entre 120 et 175 permet de conclure à une activité significative et un T/C supérieur à 175 permet de conclure à un haut niveau d'activité anti-leucémique. Un T/C inférieur à 75 exprime la toxicité du composé testé à la dose  
30 administrée.

Le tableau 1 suivant exprime les résultats obtenus avec un minimum de 7 et un maximum de 15 souris traitées pour chaque groupe d'animaux traités par un alcaloïde de *Vinca* ou pour le groupe témoin.

Le tableau 1 rassemble les résultats de T/C obtenus pour chaque alcaloïde de *Vinca* testé.

Les figures 3 et 4 expriment la supériorité de l'activité antileucémique des déoxyvinblastines 4'R et 4'S comparées à la vinblastine et à la vincristine.

Tableau 1

Dose en mg/kg	0,63	1,25	2,5	5	10	20	40
T/C de la Vinblastine	114	114	129	143	57		
T/C de la Vincristine	114	143	143	100	57		
T/C de la 4'-S-Déoxyvinblastine	114	143	200	100	57		
T/C de la 4'-R-Déoxyvinblastine	100	100	129	143	200	214	43

**Exemple 9 : Mise en évidence de l'activité antitumorale du conjugué objet de l'invention *in vivo* sur des tumeurs humaines de différentes origines**

Afin de démontrer le bénéfice de l'adressage des composés de chimiothérapie déoxyvinblastine (4'-R) et (4'-S) (respectivement nommés RDV et SDV sur la figure 5) par un anticorps humanisé dirigé contre l'IGF-1R,  $5.10^6$  cellules de cancer du poumon non à petites cellules A549 ont été implantées en position sous cutanée sur le flanc droit de souris Swiss Nude. Sept jours après implantation des cellules, les tumeurs sont mesurables et les animaux sont répartis au hasard en 6 groupes de 6 souris et traitées selon le protocole suivant :

- h7C10 : deux fois par semaine à raison de 250 µg/dose durant toute la durée de l'expérience ;

- RDV et SDV : 4 injections intrapéritonéales séparées de 7 jours à la dose de 0,35 mg/kg qui correspond à la dose de chacun des composés présents dans les conjugués ;

- les groupes d'animaux recevant les composés de chimiothérapie couplés à l'anticorps reçoivent respectivement 0,35 mg/kg de chacun des agents de chimiothérapie et 250 µg/dose d'anticorps. Ces conjugués sont administrés selon les mêmes modalités que les groupes recevant les composés de chimiothérapie seuls ;

5        - les animaux du lot contrôle sont administrés selon la même fréquence et reçoivent des injections de PBS.

Le poids des souris et le volume tumoral sont évalués deux fois par semaine. Les volumes tumoraux sont calculés selon la formule  $\frac{1}{2}$  (longueur x largeur x hauteur).

Les résultats sont montrés dans la figure 5.

10        Les animaux ne recevant que RDV ou SDV évoluent de la même façon que le groupe témoin ce qui semble cohérent par rapport aux doses optimales habituellement injectées pour ces deux composés qui sont respectivement de 20 mg/kg et 2,5 mg/kg. De façon surprenante lorsque chacun des composés est couplé à l'anticorps h7C10, une inhibition très significative de la croissance tumorale est observée. Cette inhibition est  
15        significativement plus forte que celle observée avec l'anticorps seul administré à la même concentration.

L'ensemble de ces résultats semble indiquer que le ciblage des cellules par l'anticorps h7C10 favorise la concentration de la drogue dans la cellule à cibler et permet d'observer de ce fait des inhibitions de prolifération tumorales significatives à  
20        des doses de produit de chimiothérapie faibles et notamment à des doses parfaitement non toxiques chez la souris comme cela est démontré par l'absence de perte de poids des animaux (données non communiquées).

## REVENDICATIONS

1. Composé comprenant au moins une molécule d'agent actif couplé à un système d'adressage, caractérisé en ce que ladite au moins une molécule d'agent actif  
5 est un composé cytotoxique et/ou cytostatique fort choisi parmi les alcaloïdes de *Vinca* et en ce que ledit système d'adressage est un anticorps polyclonal ou monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de cibler les cellules tumorales.
2. Composé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend de 1 à 50 molécules d'agent actif, préférentiellement de 1 à 10 et encore mieux de 1 à 6.
- 10 3. Composé selon la revendication 1 ou 2 à titre de médicament.
4. Composé selon l'une des revendications 1 à 3 destiné au traitement du cancer.
5. Composé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit anticorps est également capable d'inhiber la prolifération des cellules  
15 tumorales et/ou la restauration des fonctions apoptotiques.
6. Composé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit alcaloïde de *Vinca* est sélectionné parmi la vinblastine, la déoxyvinblastine, la vincristine, la vindésine, la vinorelbine, la vinépidine, la vinfosiltine, la vinzolidine, la vinflunine.
- 20 7. Composé selon la revendication 6, caractérisé en ce que ledit alcaloïde de *Vinca* est la déoxyvinblastine (4'-R) et/ou la déoxyleurosidine (4'-S).
8. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, est capable de se fixer au récepteur humain du facteur de croissance I  
25 apparenté à l'insuline IGF-IR et, le cas échéant, d'inhiber la fixation naturelle de ses ligands IGF1 et/ou IGF2 et/ou capable d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR.
9. Composé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère  
30 comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la séquence

présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

10. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 ou 9, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR de séquence SEQ ID No. 12 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 12.

11. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

12. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6.

13. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 12, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

14. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 13, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, ne se fixe pas de manière significative au récepteur humain IR de l'insuline.

15. Composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal est sécrété par l'hybridome murin déposé à la CNCM, Institut Pasteur, Paris, le 19 septembre 2001 sous le numéro I-2717.

16. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 54, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 54, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 69, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 69.

17. Composé selon la revendication 16, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal est un anticorps chimérique et comprend en outre les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps d'une espèce hétérologue à la souris.

18. Composé selon la revendication 17, caractérisé en ce que ladite espèce hétérologue est l'Homme.

19. Composé selon la revendication 18, caractérisé en ce que les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain sont respectivement la région kappa et, gamma-1, gamma-2 ou gamma-4.

20. Composé selon l'une quelconque des revendications 8 à 14, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal est un anticorps humanisé et comprend une chaîne légère et/ou une chaîne lourde dans lesquelles les segments de squelette FR1 à FR4 de ladite chaîne légère et/ou chaîne lourde sont dérivés respectivement de segments de squelette FR1 à FR4 de chaîne légère et/ou de chaîne lourde d'anticorps humains.

21. Composé selon la revendication 20, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 61 ou 65, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 61 ou 65, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 75, 79 ou 83, ou



une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 75, 79 ou 83.

22. Composé selon la revendication 20 ou 21, caractérisé en ce que ledit anticorps monoclonal comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 65, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 79 ou 83, de préférence SEQ ID No. 83.

23. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit anticorps consiste en un anticorps bispécifique et en ce qu'il comprend, un second motif inhibant spécifiquement la fixation de l'EGF sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR et/ou inhibant spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.

24. Composé selon la revendication 23, caractérisé en ce qu'il est bivalent ou tétravalent.

25. Composé selon la revendication 23 ou 24, caractérisé en ce que ledit second motif est sélectionné parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fab', Fab'PEG, scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demi-vie aurait été augmentée.

26. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le couplage est un couplage chimique.

27. Composé selon la revendication 26, caractérisé en ce que le couplage chimique se compose d'un ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca*, d'un ancrage sur l'anticorps et d'un lien reliant ces deux ancrages.

28. Composé selon la revendication 27 caractérisé en ce que l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé sur la fonction alcool en position 4 après déacétylation du groupement 4-acétoxy dudit alcaloïde de *Vinca*.

29. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé sur la fonction acide en position 3 après déacétylation du groupement 4-acétoxy et déméthylation de la fonction ester en position 3 dudit alcaloïde de *Vinca*.



30. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé sur la fonction acide en position 3 directement par réaction sur la fonction ester en position 3 dudit alcaloïde de *Vinca*.

31. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé par une fonction ester ou thioester sur la fonction hydroxyle en position 3.

32. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'alcaloïde de *Vinca* est réalisé par une fonction amide ou une fonction ester ou une fonction hydrazide sur la fonction acide en position 4.

33. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'anticorps est réalisé sur les oligosaccharides, les lysines et/ou les acides aspartique et glutamique.

34. Composé selon la revendication 33, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'anticorps est réalisé par réaction d'une fonction amine, d'une fonction hydrazine, d'une fonction hydrazide ou d'une fonction acide activée.

35. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que l'ancrage sur l'anticorps est réalisé par réaction d'une fonction époxyde ou d'une fonction disulfure, d'une fonction sulfure, d'une fonction acide activée avec un résidu azoté ou avec un résidu hydroxylé ou avec un résidu thiol dudit anticorps.

36. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le lien reliant les deux ancrages est constitué d'une chaîne peptidique.

37. Composé selon la revendication 27, caractérisé en ce que le lien reliant les deux ancrages est constitué d'une chaîne carbonée, linéaire ou ramifiée.

38. Composé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que un ou plusieurs groupements aromatiques, éthyléniques ou acétyléniques ainsi qu'une ou plusieurs fonctions cétone, amide, ester, hydrazide, hydrazone, amine, éther, sulfure, disulfure sont inclus dans la chaîne carbone de façon distincte ou combinée.

39. Composé selon la revendication 26, caractérisé en ce que l'alcaloïde de *Vinca* est couplé directement avec un résidu azoté ou avec un résidu hydroxylé ou avec un résidu thiol de l'anticorps.



40. Composé selon la revendication 26, caractérisé en ce que la fonction acide en position 4 de l'alcaloïde de *Vinca* est couplée, par l'intermédiaire d'une fonction hydrazide, avec un résidu aldéhydique de l'anticorps préalablement généré.

41. Composition comprenant un composé selon l'une quelconque des  
5 revendications 1 à 40.

42. Utilisation d'un composé selon l'une quelconque des revendications 1 à 40 et/ou d'une composition selon la revendication 41 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de cancer.

43. Utilisation selon la revendication 42, caractérisée en ce que ledit cancer  
10 est un cancer choisi parmi le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre ou le cancer du côlon.

1/2

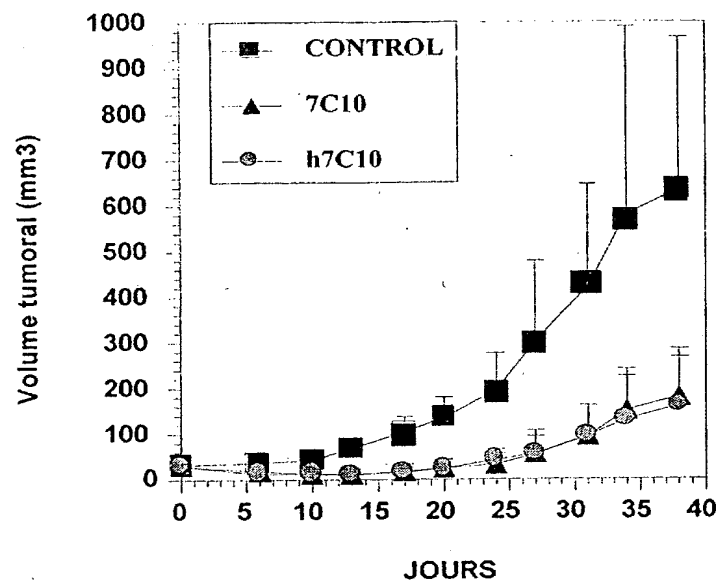


FIGURE 1

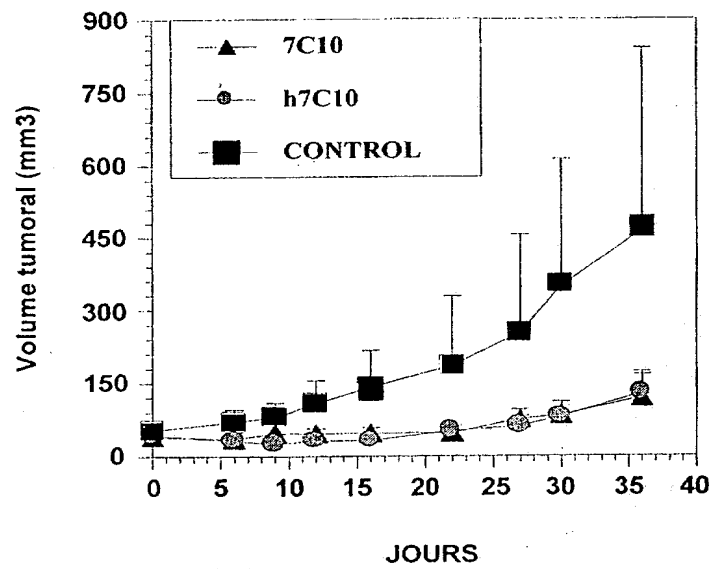


FIGURE 2



2/2

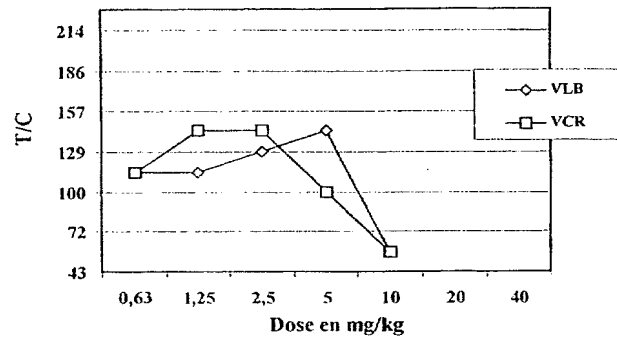


FIGURE 3

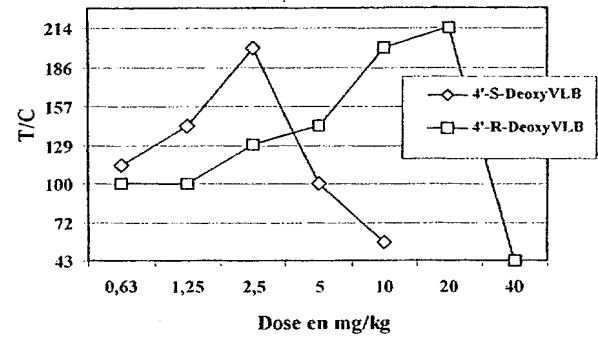


FIGURE 4

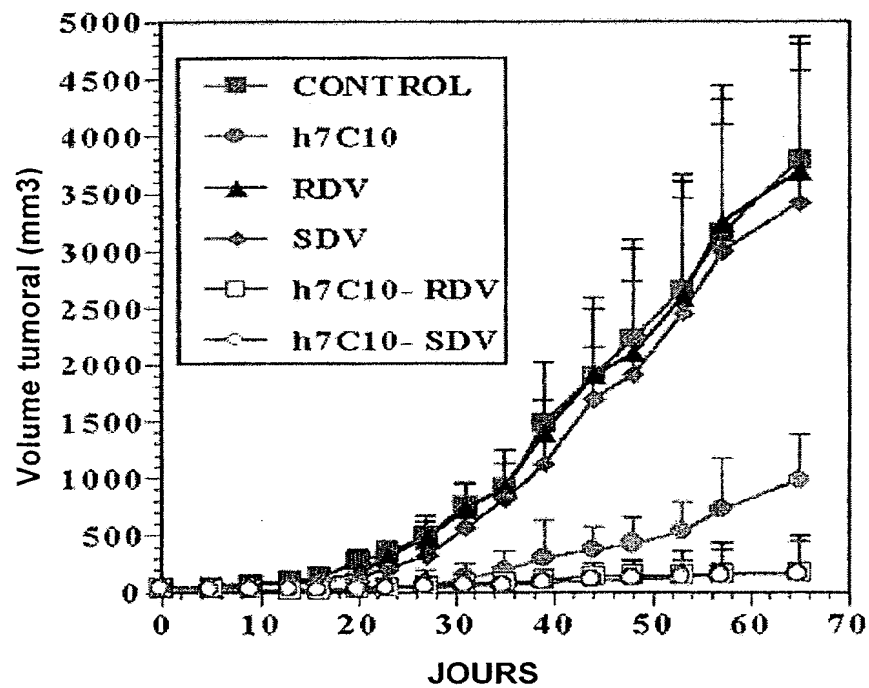


FIGURE 5

## LISTE DE SEQUENCES

<110> Pierre Fabre Médicament

<120> Nouveaux immunoconjugués antitumoraux

<130> D 21449

<160> 156

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<400> 1

aga	tct	agt	cag	agc	att	gta	cat	agt	aat	gga	aac	acc	tat	tta	caa	48
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	
1				5					10					15		

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 3

aaa	gtt	tcc	aac	cga	ctt	tat	21
Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	
1				5			

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr
1				5		



<210> 5  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(27)

<400> 5  
ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg  
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
1 5

27

<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 6  
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
1 5

<210> 7  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(18)

<400> 7  
ggt ggt tat tta tgg aac  
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn  
1 5

18

<210> 8  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

<400> 8  
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn  
1 5

<210> 9  
<211> 48  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(48)

<400> 9

tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct ctc aaa gat 48  
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp  
           1                  5                  10                  15

<210> 10  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 10  
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp  
           1                  5                  10                  15

<210> 11  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(24)

<400> 11  
 tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac 24  
 Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr  
           1                  5

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 12  
 Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr  
           1                  5

<210> 13  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 13  
 atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

<210> 14  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 14  
 atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15  
 <211> 26  
 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 15

atgaagwtgt ggttaaactg ggtttt

26

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 16

atgractttg ggytcagctt grt

23

<210> 17

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 17

atggactcca ggctcaattt agtttt

26

<210> 18

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 18

atggctgtcy trgsgcttct cttctg

26

<210> 19

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 19

atggratgga gckggrtctt tmtctt

26

<210> 20

<211> 23

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 20

atgagagtgc tgattctttt gtg

23

<210> 21

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 21

atggmttggg tgtggamctt gctatt

26

<210> 22



<211> 26  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 22  
atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 23  
atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 24  
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 25  
atgaagttgc ctggttaggct gttggtgct 29

<210> 26  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 26  
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 27  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 27  
atgagtgtgc tctactcaggt cct 23

<210> 28  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 28  
atgaggrccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 29  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 29  
atggatttwc aggtgcagat twtcagctt

29

<210> 30  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 30  
atggatttwc argtgcagat twtcagctt

29

<210> 31  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 31  
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg

26

<210> 32  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 32  
atgggcwtca agatggagtc aca

23

<210> 33  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 33  
atgtggggay ctktttycmm tttttcaat

29

<210> 34  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 34  
atggtrtccw casctcagtt cctt

24

<210> 35  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

<400> 35

atgtatatat gtttgttgtc tatttc

26

<210> 36  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 36  
 atggaagccc cagctcagct tctctt

26

<210> 37  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 37  
 atgragtywc agacccaggt cttyrt

26

<210> 38  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 38  
 atggagacac attctcaggt ctttgt

26

<210> 39  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 39  
 atggattcac aggccaggt tcttat

26

<210> 40  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 40  
 actggatggt gggagatgg

20

<210> 41  
 <211> 42  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(42)

<400> 41  
 gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser  
 1 5 10

42

<210> 42  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 42  
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser  
     1                    5                    10

<210> 43  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 43  
 ccattcttccc accatccagt 20

<210> 44  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 44  
 ccagtggata gacagatg 18

<210> 45  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(33)

<400> 45  
 gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat cca ctg 33  
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
     1                    5                    10

<210> 46  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 46  
 Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu  
     1                    5                    10

<210> 47  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 47

21

<400> 48  
atgaagttgc ctgtaggct gttggtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc aga 54  
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg  
1 5

agt gat gtt ttg atg acc caa att cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102  
Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu  
10 15 20 25

gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat 150  
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His  
30 35 40

agt aat gga aac acc tat tta caa tgg tac ctg cag aaa cca ggt cag 198  
Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
45 50 55

tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ctt tat ggg gtc 246  
Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val  
60 65 70

cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag 294  
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
75 80 85

atc	agc	agc	gtg	gag	gct	gag	gat	ctg	gga	gtt	tat	tac	tgc	ttt	caa	342
Ile	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Leu	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	
90					95					100					105	

ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc 390  
Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
110 115 120

aaa cgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc ccaccatcca gt 438  
Lys

```

<400> 49
Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln
  1             5             10             15
Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser
          20             25             30

```

Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu  
           35                                  40                                  45  
 Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
           50                                  55                                  60  
 Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser  
           65                                  70                                  75                                  80  
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu  
                                   85                                  90                                  95  
 Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr  
                   100                                  105                                  110  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
           115                                  120

<210> 50  
 <211> 438  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<400> 50  
 tacttcaacg gacaatccga caaccacgac tacaagacct aaggacgaag gtcttcacta 60  
 caaaactact ggggtttaagg tgagagggac ggacagtcag aacctctagt tcggaggtag 120  
 agaacgtcta gatcagtcctc gtaacatgta tcattacctt tgtggataaa tgttaccatg 180  
 gacgtctttg gtccagtcag aggttttcgag gactagatgt ttcaaagggt ggctgaaata 240  
 ccccagggtc tgtccaagtc accgtcacct agtccctgtc taaagtgtga gttctagtcg 300  
 tcgcacctcc gactcctaga cctcaaata atgacgaaag ttccaagtgt acaaggcacc 360  
 tgcaagccac ctccgtggtt cgacctttag tttgcccgac tacgacgtgg ttgacatagg 420  
 tagaagggtg gtaggtca 438

<210> 51  
 <211> 438  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (25) .. (405)

<400> 51  
 atgatggtgt taagtcttct gtac ctc ttg aca gcc att cct ggt atc ctg 51  
                                   Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu  
                                   1                                  5  
 tct gat gta cag ctt cag gag tca gga cct ggc ctc gtg aaa cct tct 99  
 Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser  
   10                                  15                                  20                                  25  
 cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc acc ggc tac tcc atc acc ggt 147  
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly  
                                   30                                  35                                  40  
 ggt tat tta tgg aac tgg atc cgg cag ttt cca gga aac aaa ctg gag 195  
 Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu  
                   45                                  50                                  55

tgg atg ggc tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct 243

Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser  
60 65 70

ctc aaa gat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt 291  
Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe  
75 80 85

ttc ctg aag ttg aat tct gtg act aat gaa gac aca gct aca tat tac 339  
Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
90 95 100 105

tgt gca aga tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc 387  
Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
110 115 120

act ctc aca gtc tcc tca gccaaaacga caccgccatc tgtctatcca ctg 438  
Thr Leu Thr Val Ser Ser  
125

<210> 52

<211> 127

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 52

Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu  
1 5 10 15

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys  
20 25 30

Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile  
35 40 45

Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr  
50 55 60

Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile  
65 70 75 80

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val  
85 90 95

Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val  
100 105 110

Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120 125

<210> 53

<211> 438

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 53

tactaccaca attcagaaga catggacaac tgctcggttaag gaccatagga cagactacat 60  
gtcgaagtcc tcagtcctgg accggagcac tttggaagag tcagagacag agagtggacg 120

```

agacagtggc cgatgaggta gtggccacca ataaatacct tgacctaggc cgtcaaaggt 180
cctttgtttg acctcaccta cccgatgtat tcgatgctgc catgggttatt gatgtttggt 240
agagagtttc tagcttagag gtagtgagca ctgtgtagat tcttgggtcaa aaaggacttc 300
aacttaagac actgattact tctgtgtcga tgtataatga cacgttctat gccatcccag 360
aagaaactga tgaccccggt tccgtggtga gagtgtcaga ggagtcgggt ttgctgtggg 420
ggtagacaga taggtgac 438

```

<210> 54  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 54  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
           20                  25                  30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                  40                  45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro  
       50                  55                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
   65                  70                  75                  80  
 Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
           85                  90                  95  
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
       100                  105                  110

<210> 55  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 55  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
   1                  5                  10                  15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
           20                  25                  30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                  40                  45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
       50                  55                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
   65                  70                  75                  80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
           85                  90                  95  
 Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys



100

105

110

<210> 56  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 56  
 Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
           1                  5                  10                  15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
                   20                  25                  30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                  40                  45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                  55                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
           65                  70                  75                  80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                   85                  90                  95  
 Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                  105                  110

<210> 57  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 57  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
           1                  5                  10                  15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                  25                  30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
           35                  40                  45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
           50                  55                  60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
           65                  70                  75                  80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
                   85                  90                  95  
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
                   100                  105                  110

<210> 58  
 <211> 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 58

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105 110

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 59

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
 85 90 95

Leu Gln Thr Pro  
 100

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; VARIANT

<222> (35)..(36)

<223> XAA correspond à n'importe quel acide aminé

<220>

<221> VARIANT

<222> (39)

<223> XAA correspond à n'importe quel acide aminé

<220>

<221> VARIANT

<222> (99)

<223> XAA correspond à n'importe quel acide aminé

<400> 60

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asp Gly Xaa Xaa Tyr Leu Xaa Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala  
85 90 95

Leu Gln Xaa Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

<400> 63  
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala  
1 5 10 15  
Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
20 25 30

```
<210> 64
<211> 433
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<210> 65
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 65  
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly  
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110.

<210> 66

<211> 433

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(414)

<400> 66

gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51  
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu  
1 5 10

atg ttc tgg ttt cct gct tcc agc agt gat att gtg atg act cag tct 99  
Met Phe Trp Phe Pro Ala Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser  
15 20 25

cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc 147  
Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys  
30 35 40

agg tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg caa 195  
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln  
45 50 55

tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa 243  
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys  
60 65 70

gtt tct aat cgg ctt tat ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga 291  
Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
75 80 85 90

tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat 339  
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp  
95 100 105

gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc 387  
Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe  
110 115 120

ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gagtggatcc tctgcg 433  
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
125 130

<210> 67

<211> 131

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 67

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala  
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val  
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile  
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro  
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr  
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val  
 115 120 125

Glu Ile Lys  
 130

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 433

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 68

cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60  
 aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagagggg cgggcagtg 120  
 ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtct cgtaacatgt atcattacct 180  
 ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240  
 tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300  
 ctaaaatgtg acttttagtc gtctcaacct cgactcctac aaccccaaat aatgacgaaa 360  
 gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420  
 acctaggaga cgc 433

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 69

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly  
 20 25 30

Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 70  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 70  
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30

Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp  
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 71  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 71  
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln  
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly  
 20 25 30

Tyr Trp Asn Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp



35                      40                      45  
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
     50                      55                      60  
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Phe  
     65                      70                      75                      80  
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                             85                      90                      95  
 Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
                             100                      105                      110  
 Thr Val Thr Val Ser Ser  
                             115

<210> 72  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 72  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
     1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr  
                             20                      25                      30  
 Trp Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                             35                      40                      45  
 Ile Gly Arg Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu  
     50                      55                      60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
     65                      70                      75                      80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                             85                      90                      95  
 Ala Arg Glu Leu Pro Gly Gly Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
                             100                      105                      110  
 Val Thr Val Ser Ser  
                             115

<210> 73  
 <211> 123  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 73  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
     1                      5                      10                      15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly  
                             20                      25                      30



Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
           35                                  40                                  45  
 Ile Gly Ser Met Phe His Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
           50                                  55                                  60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
           65                                  70                                  75                                  80  
 Leu Gln Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                                  90                                  95  
 Ala Arg Gly Arg Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Asn Trp Phe Asp Pro  
                                   100                                  105                                  110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
           115                                  120

<210> 74  
 <211> 98  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 74  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly  
           20                                  25                                  30  
 Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
           35                                  40                                  45  
 Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu  
           50                                  55                                  60  
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
           65                                  70                                  75                                  80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                   85                                  90                                  95  
 Ala Arg

<210> 75  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 75  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly  
           20                                  25                                  30  
 Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
           35                                  40                                  45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
 50 55 60

Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 76

<211> 445

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(426)

<400> 76

gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51  
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu  
 1 5 10

aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99  
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
 15 20 25

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147  
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val  
 30 35 40

tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195  
 Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln  
 45 50 55

ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atg ggg tat atc agc tac gac ggt 243  
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly  
 60 65 70

acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga atc acc ata tca cgt 291  
 Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg  
 75 80 85 90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339  
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
 95 100 105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387  
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe  
 110 115 120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436  
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 125 130

tcctctgcg

445

&lt;210&gt; 77

&lt;211&gt; 135

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 77

Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile  
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 35 40 45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro  
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 445

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 78

cagtccttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60  
 ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcgggaagc 120  
 ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtggccacc aataaatacc 180  
 ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct accccatata gtcgatgctg 240  
 ccattggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagcttagt ggtatagtgc actgtgcagg 300  
 ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360  
 acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttgga ccagtggcag 420  
 aggagtccac tcacctagga gacgc 445

&lt;210&gt; 79

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 79

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly  
 20 25 30  
 Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45  
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
 50 55 60  
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110  
 Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 80  
 <211> 445  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(426)

<400> 80  
 gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51  
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu  
 1 5 10  
 aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99  
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
 15 20 25  
 cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147  
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val  
 30 35 40  
 tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195  
 Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln  
 45 50 55  
 ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243  
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly  
 60 65 70  
 acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca cgt 291  
 Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg  
 75 80 85 90  
 gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339  
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala



26

	95	100	105	
gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt				387
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe				
	110	115	120	
gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga				436
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	125	130		
tcctctgcg				445

<210> 81  
 <211> 135  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 81  
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
 20 25 30  
 Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr  
 35 40 45  
 Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
 85 90 95  
 Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 115 120 125  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130

<210> 82  
 <211> 445  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 82  
 cagtccttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60  
 ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120  
 ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180  
 ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240  
 ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtgc actgtgcagg 300  
 ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360  
 acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttgga ccagtggcag 420  
 aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 83  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 83  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
           1                  5                  10                  15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly  
                   20                  25                  30  
 Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
                   35                  40                  45  
 Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu  
           50                  55                  60  
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
           65                  70                  75                  80  
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95  
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
                   100                  105                  110  
 Val Thr Val Ser Ser  
           115

<210> 84  
 <211> 445  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (22)..(426)

<400> 84  
 gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51  
                           Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu  
                                   1                  5                  10  
 aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tgg ggc 99  
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly  
                   15                  20                  25  
 cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147  
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val  
                   30                  35                  40  
 tct ggt tac tcc atc agc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195  
 Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln  
                   45                  50                  55  
 ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243



Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly  
60 65 70

acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca gtg 291  
Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val  
75 80 85 90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339  
Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala  
95 100 105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387  
Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe  
110 115 120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436  
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
125 130

tcctctgcg 445

<210> 85  
<211> 135  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 85  
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile  
1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro  
20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser  
35 40 45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro  
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln  
85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr  
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
130

<210> 86  
<211> 445  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens



<400> 86  
 cagtccttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60  
 ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtccctgacca cttcggaagc 120  
 ctctgggaca gggagtggtgac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180  
 ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240  
 ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtca cctgtgcagg 300  
 ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360  
 acacgtctta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttgga ccagtggcag 420  
 aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 87  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
 Oligonucléotide

<400> 87  
 gtcagaacgc gtgccgcc 18

<210> 88  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
 Oligonucléotide

<400> 88  
 accatgaagt tgctgttag gctgttggtg ct 32

<210> 89  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
 Oligonucléotide

<400> 89  
 gatgttctgg tttctgctt ccagcagtga tg 32

<210> 90  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Séquence artificielle

<220>  
 <223> Description de la séquence artificielle:  
 Oligonucléotide

<400> 90  
 ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc cc 32



<210> 91  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 91  
gtcacccctg gagagccggc ctccatctcc tg 32

<210> 92  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 92  
caggtctagt cagaccatta tacatagtaa tg 32

<210> 93  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 93  
gaaacaccta tttggaatgg tacctgcaga 30

<210> 94  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 94  
ggcaacttca tgggtggcggc acgcgttctg ac 32

<210> 95  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:

## Oligonucléotide

&lt;400&gt; 95

gaaaccagaa catcagcacc aacagcctaa ca

32

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

&lt;400&gt; 96

ctgagtcac acaacatcac tgctggaagc ag

32

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

&lt;400&gt; 97

tctccagggg tgacgggcag ggagagtgga ga

32

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

&lt;400&gt; 98

tctgactaga cctgcaggag atggaggccg gc

32

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Séquence artificielle

&lt;220&gt;

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

&lt;400&gt; 99

aaataggtgt ttccattact atgtacaatg c

31

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 100

cagggcagtc tccacagctc ctgatctata aa

32

<210> 101

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 101

gtttctaadc ggctttatgg ggtccctgac ag

32

<210> 102

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 102

gttcagtggc agtggatcag gcacagattt ta

32

<210> 103

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 103

cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg at

32

<210> 104

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 104

gttgggggttt attactgctt tcaagggttca ca

32

<210> 105  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 105  
tggttcggtg acgttcggcc aagggaccaa gg 32  
  
<210> 106  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 106  
tggaaatcaa acgtgagtgg atcctctgcg 30  
  
<210> 107  
<211> 17  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 107  
tctgcaggta ccattgc 17  
  
<210> 108  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 108  
tgcaatggta cctgcagaag c 21  
  
<210> 109  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 109  
agactgccct ggcttctgca ggtaccattg ca 32

<210> 110  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 110  
cgattagaaa ctttatagat caggagctgt gg 32

<210> 111  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 111  
tgccactgaa cctgtcaggg accccataaa gc 32

<210> 112  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 112  
gattttcagt gtaaaatctg tgccatgatcc ac 32

<210> 113  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 113  
taaaccctcaa catcctcagc ctccactctg ct 32

<210> 114  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 114

tccacggaac atgtgaacct tgaaagcagt aa

32

<210> 115

<211> 31

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 115

tttgatttcc accttgggtcc cttggccgaa c

31

<210> 116

<211> 19

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 116

cgcagaggat ccactcacg

19

<210> 117

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 117

gtcagaacgc gtgccgcc

18

<210> 118

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 118

accatgaaag tgttgagtct gttgtacctc ttga

34



<210> 119  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 119  
cagccattcc tggatcctg tctcaggtgc agct 34  
  
<210> 120  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 120  
tcaggagtcg ggcccaggac tggatgaagcc ttcg 34  
  
<210> 121  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 121  
gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggt 33  
  
<210> 122  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide  
  
<400> 122  
tactccatca ccggtgggta tttatggaac tgg 33  
  
<210> 123  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle  
  
<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide



<400> 123  
atacgggcagc ccccagggaa gggactggag tgg 33

<210> 124  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 124  
atgggggtata tcagctacga cggtaccaat aac 33

<210> 125  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 125  
tcaacacttt catggtggcg gcacgcgttc tgac 34

<210> 126  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 126  
ataccaggaa tggctgtcaa gaggtacaac agac 34

<210> 127  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 127  
tgggcccgcac tcctgaagct gcacctgaga cagg 34

<210> 128  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 128  
tgagggacag ggtctccgaa ggcttcacca gtcc 34

<210> 129  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 129  
ccaccggtga tggagtaacc agagacagtg cagg 34

<210> 130  
<211> 34  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 130  
ccctgggggc tgccgtatcc agttccataa ataa 34

<210> 131  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 131  
tagctgatat accccatcca ctccagtccc tt 32

<210> 132  
<211> 16  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 132  
gttattggta ccgtcg 16

<210> 133

<211> 21  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 133  
tacgacggtg ccaataacta c

21

<210> 134  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 134  
aaaccctccc'tcaaggatcg aatcaccata tc

32

<210> 135  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 135  
acgtgacacg tccaagaacc agttctccct ga

32

<210> 136  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 136  
agctgagctc tgtgaccgct gcggacactg ca

32

<210> 137  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 137

gtgtattact gtgcgagata cggtagggtc tt

32

<210> 138

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 138

ctttgactac tggggccagg gaaccctggt ca

32

<210> 139

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 139

ccgtctctctc aggtgagtgg atcctctgcg

30

<210> 140

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 140

agggagggtt tgtagttatt ggtaccgtcg ta

32

<210> 141

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 141

acgtgtcacg tgatatggtg attcgatcct tg

32

<210> 142

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 142  
agagctcagc ttcagggaga actggttctt gg

32

<210> 143  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 143  
cagtaataca ctgcagtgtc cgcagcggtc ac

32

<210> 144  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 144  
agtagtcaaa gaagacccta ccgtatctcg ca

32

<210> 145  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 145  
ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc ccc

33

<210> 146  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Séquence artificielle

<220>  
<223> Description de la séquence artificielle:  
Oligonucléotide

<400> 146  
cgcagaggat ccactcac

18

<210> 147  
<211> 31

<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 147  
ctggttactc catcagcggg ggttatttat g 31

<210> 148  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 148  
cataaataac caccgctgat ggagtaacca g 31

<210> 149  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 149  
gggactggag tggatcgggt atatcagcta c 31

<210> 150  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 150  
gtagctgata taccgatcc actccagtcc c 31

<210> 151  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 151  
tccttcaagg atcgagtcac catatcacgt g 31

<210> 152  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 152  
cacgtgatat ggtgactcga tccttgaggg a 31

<210> 153  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 153  
gatcgagtca ccatatcagt ggacacgtcc aagaaccag 39

<210> 154  
<211> 39  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 154  
ctgggttcttg gacgtgtcca ctgatatggt gactcgatc 39

<210> 155  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 155  
gcttcagca gtgatattgt gatgactcag t 31

<210> 156  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens

<400> 156  
actgagtcac cacaatatca ctgctggaag c 31

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

**DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S)** Page N° 1/1

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 270601

<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b>		
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL</b>		240772 D21449 MIP
<b>TITRE DE L'INVENTION</b> (200 caractères ou espaces) 0308938		
Nouveaux immunoconjugués antitumoraux		
<b>LE(S) DEMANDEUR(S) :</b>		
PIERRE FABRE MEDICAMENT : 45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT FRANCE		
<b>DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :</b>		
<b>1</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	GOETSCH Liliane
	Code postal et ville	15, route de Cluses
Société d'appartenance (facultatif)		74130 AYZE
<b>2</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	DUFLOS Alain
	Code postal et ville	7, rue Emile Caraguel
Société d'appartenance (facultatif)		81290 LABRUGUIERE
<b>3</b>	Nom	
	Prénoms	
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
<b>DATE ET SIGNATURE(S)</b> <b>DU (DES) DEMANDEUR(S)</b> <b>OU DU MANDATAIRE</b> <b>(Nom et qualité du signataire)</b>		

03/10/03

*[Signature]*

92-1142